

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

ЛЕКЦІЯ 2

Тема: Генетика прокаріот

План:

1. Організація генетичного апарату прокаріотів
2. Бактеріофаги
3. Віруси

1. Організація генетичного апарату прокаріот

Прокаріотична клітина відрізняється порівняно простою організацією (відсутність ядра та розвиненої компартменталізації, відсутність мейозу, порівняно невелика кількість ДНК), що робить її зручним об'єктом досліджень. Саме вивчення прокаріотів зіграло провідну роль у з'ясування багатьох базових принципів функціонування генетичного апарату, особливо в перші десятиліття після початку інтенсивних досліджень молекулярних основ спадковості. При збереженні загальних принципів, організація та функціонування спадкового апарату таких порівняно простих систем має певні особливості. Як правило, бактеріальний геном представлений однією циркулярною молекулою ДНК (бактеріальною хромосомою). Ця ДНК взаємодіє з білками, формуючи нуклеоїд, який займає певну зону бактеріальної клітини. Загальна довжина хромосоми, наприклад, у *Escherichia coli*, становить 4,6 млн пар основ, близько 90 % яких припадають на кодуючі послідовності. Середній розмір гена *E. coli* - 950 пар основ (прокаріотичні гени не містять інтронів), середня довжина міжгенної ділянки - 118 пар основ. Проте міжгенні зони мають досить нерівномірний розподіл по довжині, яка варіює від 0 до 1730 пар основ.

У бактеріальному геномі присутні також мобільні елементи класу ДНК-транспозонів, цілком аналогічні транспозонам у геномах еукаріотів. Бактеріальні транспозони поділяють на два типи, які дещо різняться між собою за будовою послідовностей і довжиною: IS-елементи (insertion sequences), розмір яких варіює від 700 до 1400 пар основ, і власне транспозони (Tn) більшого розміру. Транспозони обох типів часто містять гени транспозази. Транспозаза здійснює каталіз хімічних реакцій, які забезпечують переміщення транспозона в інше місце геному. Крім генів транспозази у складі Tn-транспозонів можуть бути присутніми інші гени.

Реплікація бактеріальної хромосоми розпочинається з ділянки ориджину і продовжується в обидва боки двома реплікативними вилками. Вважається, що ориджин при цьому взаємодіє з клітинною мембраною; між новим (щойно синтезованим) і старим ориджинами під час реплікації нарощується клітинна оболонка, по завершенні реплікації відбувається поділ дочірніх клітин - до кожної переходить повний материнський набір генів.

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

Характерною відзнакою бактерій є наявність у клітині, поряд із бактеріальною хромосомою, невеликих автономних елементів геному - плазмід. Плазміда є циркулярною молекулою ДНК (типовий розмір близько 3 тис. пар основ), яка містить кілька генів і реплікується незалежно від бактеріальної хромосоми (має власний ориджин). Плазмід широко використовуються як зручний інструмент молекулярно-біологічних досліджень.

Хоча бактерії розмножуються шляхом клітинного поділу, у них спостерігається також своєрідний "статевий процес" перенесення генетичного матеріалу від однієї клітини до іншої. Таке перенесення відбувається під час кон'югації - безпосереднього контакту між клітинами. Залежить кон'югація від присутності в одній із клітин особливої плазмиди - F-фактора (фактора фертильності) - яка, як і багато інших плазмід, може існувати автономно, а може вбудовуватись у бактеріальну хромосому шляхом сайт-специфічної рекомбінації.

2. Бактеріофаги

Бактеріофаги (бактеріальні віруси) поділяють на два типи: вірулентні, які проникають у клітину, розмножуються та зумовлюють руйнування клітини (літичний шлях), і помірні - такі, що можуть використовувати або літичний шлях, або шлях лізогенії, коли ДНК фага за допомогою сайт-специфічної рекомбінації (див. наступний підрозділ) вбудовується в бактеріальний геном (фаг перетворюється на профаг). В останньому випадку за несприятливих для бактерії умов може відбуватися індукція бактеріофага - перехід до літичного шляху.

Процес перенесення генетичного матеріалу між бактеріальними клітинами за рахунок активності бактеріофагів називають трансдукцією. Здійснюють її зазвичай помірні бактеріофаги: після практично необмеженого існування фагової ДНК у бактеріальному геномі, індукція іноді зумовлює вирізання фагової ДНК разом із бактеріальними ділянками. Далі відбувається реплікація цієї ДНК, синтез білків оболонки бактеріофага (закодованих у генах фагової ДНК) і збирання фагових частинок. Фагові частинки потім інфікують інші клітини, і якщо реалізується шлях лізогенії, вбудовуються в ДНК клітини-хазяїна разом із захопленими раніше бактеріальними генами. До помірних фагів належать, зокрема, фаги P1, P22, λ . ДНК помірних фагів може розглядатися як частина бактеріального геному, яка іноді виходить з під контролю: гени бактеріофага жодним чином не відрізняються від бактеріальних, тобто перебувають під контролем промоторів, що впізнаються бактеріальною РНК-полімеразою клітини-хазяїна.

Бактеріофаги групи Т відносять до таких, що реалізують тільки літичний шлях. Як і для помірних фагів, їхній геном представлений однією лінійною дволанцюговою ДНК. ДНК Т-парних фагів (Т2, Т4, Т6) містить приблизно 200 тис. пар основ, фагові гени кодують білки системи реплікації (у тому числі й власну ДНК-полімеразу), білки фагової оболонки та певні регуляторні білки,

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

що сприяють перемиканню роботи клітинних систем на користь бактеріофага. Після проникнення ДНК у клітину починається транскрипція групи фагових генів бактеріальною РНК-полімеразою, згодом - реплікація фагової ДНК, синтез фагових білків, збирання частинок бактеріофага й лізис клітини. Аналогічно реалізується літичний шлях Т-непарними фагами (Т1, Т3, Т5, Т7), ДНК яких є трохи меншою за розміром (~40 тис. пар основ). Відразу після проникнення ДНК у клітину-хазяїна відбувається експресія гена мономерної фагової РНК-полімерази, яка далі ефективно транскрибує інші гени бактеріофага.

Бактеріальні клітини мають свою систему захисту від ДНК бактеріофагів. Основою цієї своєрідної "імунної системи" є рестриктази - велика група специфічних нуклеаз, які розрізають лише певні невеличкі (частіше чотири або шість нуклеотидів) елементи послідовності. Активність рестриктази залежить від метилювання певних азотистих основ у складі специфічних сайтів рестрикції: сайти у складі бактеріальної ДНК є метильованими й тому непомітними для рестриктази, неметилювані сайти ДНК бактеріофага залишаються чутливими.

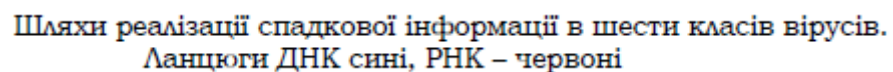
Крім фагів, котрі містять дволанцюгову ДНК як генетичний матеріал, існують ще дві групи фагів, геном яких є відхиленням від "канону".

Перша група - бактеріофаги з одноланцюговою циркулярною ДНК (φX-174, M13). Ця ДНК досить маленька, фагові гени кодують тільки 10-12 білків. Наприклад, геном (який був першим із прочитаних) φX-174 (слід читати "фі-десять") побудований надзвичайно економно: десять генів (один із них - ген А - дає дві різні молекули РНК при транскрипції) займають практично всю циркулярну ДНК бактеріофага. Більш того, декілька генів перекриваються за рахунок використання різних рамок зчитування: гени А і С та С і D перекриваються своїми кінцями, гени В, К і Е повністю містяться в межах інших генів; три гени - А, С і К - використовують усі три можливі рамки зчитування на одній ділянці ДНК (звичайно, у даному випадку всі три рамки є відкритими). Явище перекриття генів за рахунок використання різних рамок зчитування спостерігається також для кількох інших бактеріофагів і зустрічається в еукаріотів.

У бактеріальній клітині фагова ДНК, що позначається як (+)-ланцюг, використовується як матриця для синтезу (-)-ланцюга. У результаті утворюється дволанцюгова циркулярна ДНК, з неї транскрибуються гени ((-)-ланцюг є матричним), і вона, після одноланцюгового розриву в (+)-ланцюзі, використовується для реплікації за типом кільця, що котиться (див. рис. 5.2): на циркулярному (-)-ланцюзі синтезується велика кількість копій (+)-ланцюга, фрагменти нарізаються, замикаються в кільце й упаковуються у фагову оболонку. Остання група бактеріофагів (R17, F2, MS2) містить як генетичний матеріал молекулу РНК, де є тільки чотири гени (фагова РНК одночасно слугує як мРНК), що кодують: РНК-залежну РНК-полімеразу, яка здійснює копіювання фагової РНК; два білки оболонки; білок, що забезпечує лізис клітини. Таким чином, ці найменші з усіх відомих вірусів здійснюють

найпростіший шлях передачі спадкової інформації - тільки з РНК на РНК і на білок.

Віруси, що розмножуються в еукаріотичних клітинах, представлені всіма можливими варіантами щодо типу нуклеїнової кислоти, яка є носієм генетичної інформації. Залежно від цього та від шляху реалізації генетичної інформації віруси поділяють на сім класів.



Віруси класу І містять дволанцюгову ДНК і, відповідно, використовують канонічний шлях реалізації спадкової інформації. Більшість із них (аденовіруси, бакуловіруси, віруси герпесу, папіломавіруси людини, вірус мавпи SV-40) застосовують транскрипційний апарат клітини-хазяїна для синтезу мРНК, реплікація вірусної ДНК здійснюється у клітинному ядрі. Розмір геному варіює від 5,5 до 150 тис. пар основ. Як і бактеріофаги, ці ДНК-віруси можуть реалізувати лізогенетичний шлях, зберігаючись у геномі клітини-хазяїна. Поксвіруси (варіола, вакцинія), що також належать до класу І, мають ДНК досить великого розміру (~200 тис. пар основ) і власні ферменти, за допомогою яких здійснюється транскрипція та реплікація вірусної ДНК у цитоплазмі.

Віруси класу II, зокрема парвовіруси, містять одноланцюгову ДНК (~5 тис. нуклеотидів) - у вірусних частинках різних вірусів є або тільки (-)-ланцюг,

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

або один із двох типів ланцюгів. У будь-якому випадку на одноланцюговій ДНК у клітині відбувається синтез іншого ланцюга, після чого дволанцюгова ДНК служить субстратом для транскрипції та реплікації.

РНК-віруси класу III - реовіруси - використовують дволанцюгову РНК як сховище спадкової інформації. Вірусна частинка містить 10-12 окремих молекул довжиною 1-4 тис. пар основ, а також власні ферменти, що здійснюють у цитоплазмі реплікацію РНК і ампліфікацію (+)-ланцюга як мРНК для синтезу білків.

Віруси класу IV - поліовіруси, пікорнавіруси - мають одноланцюгову РНК (7-10 тис. нуклеотидів), яка є (+)-ланцюгом - РНК безпосередньо кодує вірусні білки й тому інфекційна сама по собі. Вірусна РНК є матрицею для синтезу (-)-ланцюгів, які далі використовуються для синтезу більшої кількості (+)-ланцюгів. На (+)-ланцюзі відбувається синтез єдиного поліпептиду - поліпротеїну, - який потім розрізається на окремі вірусні білки.

РНК вірусів класу V - ортоміксовіруси, зокрема вірус грипу, - є (-)-ланцюгом (~12 тис. нуклеотидів, іноді розділена на окремі фрагменти). Віруси використовують власну РНК-полімеразу для синтезу (+)-ланцюгів мРНК.

Віруси класу VI - ретровіруси, зокрема вірус імунодефіциту людини - містять два ідентичні (+)-ланцюги РНК (5-8 тис. нуклеотидів) і використовують ДНК як проміжну стадію експресії спадкової інформації. У вірусній частинці є також два ферменти: зворотна транскриптаза (РНК-залежна ДНК-полімераза) та інтеграза. Зворотна транскриптаза здійснює в цитоплазмі клітини синтез комплементарного ланцюга ДНК із використанням вірусної РНК як матриці та молекули тРНК як праймера, після чого синтезує другий ланцюг ДНК.

Дволанцюгова ДНК, що містить гени інтегрази, зворотної транскриптази, білків вірусної оболонки та довгі повтори на кінцях (LTR - long terminal repeats) у комплексі з інтегразою прямує до ядра, де інтеграза здійснює інсерцію цієї ДНК у геном. У такій формі провіруса вірусна ДНК може існувати в геномі досить довго. При активації транскрипції на провірусі клітинною РНК-полімеразою синтезується мРНК (що є одночасно вірусною (+)-РНК), відбувається трансляція та формування вірусних частинок. Як правило, ретровірус не вбиває клітину: ДНК разом із провірусом передається дочірнім клітинам, які знову здатні утворювати вірусні частинки. Зрозуміло також, що завдяки активності ретровірусів є можливим перенесення частини генетичного матеріалу від одного організму до іншого.

Віруси групи VII - ретроїдні віруси, до них належить і вірус гепатиту В, - містять дволанцюгову ДНК, вона використовується як матриця для синтезу мРНК, а також превірусної РНК. Ця остання є матрицею для синтезу вірусної ДНК за допомогою вірусної зворотної транскриптази.